第 43 卷 第 3 期
2000 年 8 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43，No.3
Aug.，2000

文章编号：0454-6296（2000）03-0285-06

粘虫咽侧体静止激素的初步分离纯化

欧阳迎春，唐 爽，关雪辰，方宇凌

（中国科学院动物研究所，农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要：用放射化学的方法，检测粘虫 *Mythimna separata* 幼虫脑提取物中咽侧体静止激素（Allatostatin，AS）样的活性物质。发现粘虫幼虫脑中含有 AS 样的活性物质，可抑制离体咽侧体（Corpora allata，CA）的保幼激素（Juvenile hormone，JH）的生物合成。用 1 个脑当量的幼虫脑提取物，对 CA 的 JH 合成的抑制率达 51%。幼虫脑提取物经胰蛋白酶水解后，AS 活性显著降低，表明幼虫脑中的活性物质是肽类或蛋白质类物质。

幼虫脑提取物用 Sep-Pak 柱初步纯化，有活性的组分经高压液相色谱（HPLC）分离，洗脱组分的 AS 活性测定表明，有 AS 活性的组分主要集中在组分 1～20 和组分 30～60，其中对离体 CA 的 JH 合成的抑制大于 50%的组分有 3、5、11、40、54 和 60。

关键词：粘虫；咽侧体静止激素；脑提取物；高压液相色谱

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A

保幼激素（Juvenile hormone，JH）是由咽侧体（Corpora allata，CA）产生的，在大多数昆虫中，JH 合成的调节不仅仅是幼虫的生长所需，而且是成虫的发育所需，特别是雌成虫的卵黄蛋白的合成。它的合成是受源于脑的神经内分泌细胞分泌的神经肽类激素——咽侧体活化激素（Allatotropin，AT）和咽侧体静止激素（Allatostatin，AS）调控的，分别对 CA 的 JH 合成起促进和抑制作用。自 Woodhead 等[1]最早从太平洋折翅蠊 *Diploptera punctata* 的脑中分离鉴定出 4 种由 8～13 个氨基酸组成的 AS 以来，人们利用分离纯化和分子克隆技术，陆续从太平洋折翅蠊以及其它种类的蜚蠊中分离出一系列相似的 AS[2]，这些 AS 都具有共同的 C-末端序列 Tyr/Phe-Phe-Gly-Leu/Ile-NH_2。目前已知结构的 AS 主要集中在蜚蠊目昆虫中，鳞翅目昆虫只从烟草天蛾 *Manduca sexta* 中分离出一种非酰胺化的 AS[3]。

本文着重研究粘虫 *Mythimna separata* 幼虫脑中 AS 样的活性物质，用高压液相色谱（High-pressure liquid chromatography，HPLC）技术分离粘虫末龄幼虫脑提取物，用放射化学的方法测定各分离组分对离体 CA 的 JH 合成的抑制能力。

1 材料和方法

1.1 昆虫

基金项目：国家自然科学基金重点项目（39630050）

收稿日期：1999-09-24；修订日期：1999-12-16

在常规的养虫条件下饲养粘虫，幼虫用人工饲料群体饲养[4]，成虫喂10%的糖水。

1.2 脑粗提物的制备

分批摘取末龄幼虫脑共900头，解剖和提取均在0.9% NaCl溶液中进行。每组取50～100个脑，于1.5 mL的Eppendorf管中，用0.9% NaCl溶液（10 μL/脑）进行匀浆，匀浆液于沸水浴中煮沸5 min，5 000 r/min离心10 min，取上清液，－80℃保存，供进一步纯化用。

1.3 脑提取物经Sep-Pak柱初步纯化

幼虫的脑提取物经Sep-Pak柱初步纯化，具体步骤如下（流速为1 mL/h）：（1）反相C_{18} Sep-Pak柱的预处理，依次用5 mL含0.1%三氟乙酸（TFA）的0.1%牛血清白蛋白（BSA）溶液，5 mL含0.1% TFA的17%乙腈溶液和5 mL 0.1% TFA溶液洗柱子；（2）装填，每个Sep-Pak柱装填250个脑当量的幼虫脑提取物，重复3次；（3）洗脱，依次用5 mL 0.1% TFA溶液，5 mL含0.1% TFA的17%乙腈溶液和3 mL含0.1% TFA的40%乙腈溶液，收集含AS活性的组分，经N_2流吹去挥发性物质，然后冷冻干燥，－80℃保存，供HPLC分离。

1.4 HPLC分离

来自上述步骤的相当于250个脑当量的含AS活性的洗脱组分，用0.1%TFA溶液稀释至250 μL，装填到3.9 mm×150 mm的反向C_{18}柱（填料颗粒5 μm，孔径90Å，Waters公司）上，HPLC是在自动梯度控制器Waters 600E型和486型检测器上进行。溶剂A为0.1% TFA水溶液，溶剂B为0.1% TFA的80%的甲醇溶液，洗脱梯度为5%到95% B液60 min，95% B液10 min，流速为1 mL/min，洗脱组分的检测波长为280 nm。按每分钟收集洗脱组分，然后进行AS活性测定。

1.5 用于活性测定的各分离组分的储存和制备

经HPLC分离的甲醇洗脱组分（含0.1% TFA）储存在－80°或立即分析。用于活性测定的组分，取一定量转移到1.5 mL含10 μL 0.1% BSA的离心管中，N_2吹干，生测时用1 mol/L HCl 10 μL重新悬浮，加入适量的培养液，再用1 mol/L NaOH中和，进行CA的培养。

1.6 AS活性的测定

幼虫脑提取物及经Sep-Pak柱和HPLC分离所收集的各组分中AS样物质的活性测定，采用离体放射化学的方法，即对离体CA合成JH能力的影响。按Feyerensen和Tobe[5]、Tobe和Clark[6]的方法并加以改进。JH合成是以L-(^{3}H-甲基）蛋氨酸（比活200 mci/mmol，NEN公司）的掺入来检测的，用异辛烷提取JH之前，将CA从培养液中移去，合成速率代表释放到培养液中的标记激素。CA在50 μL含^{3}H-甲基蛋氨酸（最终浓度为50 μmol/L）的TC199培养液中培养3 h来估计正常的合成速率，然后将CA移到含有脑提取物或各分离组分的培养液中再培养3 h，作为JH合成的处理速率，则JH合成速率变化的百分比为（1－处理速率/正常速率）×100%，来表示CA被抑制的程度。

1.7 胰蛋白酶对脑提取物中AS活性物质的影响

幼虫的脑提取物与胰蛋白酶溶液（0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液，pH 7.8，最终浓度为1 mg/L)一起，37 ℃温育4 h，然后将上述混合液煮沸20 min，使多余的酶失活，检测AS的活性。

2　结果

2.1　末龄幼虫脑提取物抑制 CA 合成 JH 的剂量反应

从图 1 可以看出，末龄幼虫脑中含有 AS 样的活性物质，当培养液中的脑提取物的含量小于 1 个脑当量时，对 CA 合成 JH 的抑制不明显，抑制率在 30% 以下。而在培养液中脑提取物的浓度达到 1 个脑当量时，对 CA 合成 JH 的抑制为 51%，非常显著，再增加脑提取物的浓度，到 5 个脑当量时，抑制率为 61%。

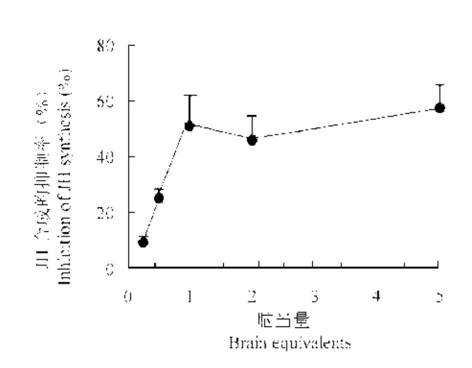


图 1　粘虫幼虫脑提取物对 CA 抑制的剂量反应

Fig.1　Dose-response inhibition of CA activity by extracts of last instar larvae brains from *M. separata*

每个点是 5～8 个重复 Each point is the mean from 5 to 8 replications

2.2　胰蛋白酶对脑提取物中 AS 活性物质的影响

用胰蛋白酶对末龄幼虫脑提取物进行水解，然后与粘虫成虫 CA 共同培养。从表 1 可以看出，幼虫脑提取物经胰蛋白酶水解后，对 CA 合成 JH 的抑制显著降低，抑制率由原来的 54.5%（5 个脑当量）降为 20%。说明幼虫脑提取物中 AS 样的活性物质对胰蛋白酶是敏感的，即这种活性物质是肽类或蛋白质类的物质。

表 1　胰蛋白酶对粘虫幼虫脑提取物 AS 活性的影响

Table 1　Effect of trypsin on the AS activity of the brain extracts from the larvae *M. separata*

处理 Treatment	每对 CA 的 JH 合成速率（pmol/h） Rate of JH synthesis per pair of CA	抑制率（%） Inhibition
对照 Control	10.31±1.09*	
脑提取物 Brain extracts	4.71±0.6*	54.48±5.82
脑提取物+胰蛋白酶 Brain extracts+Trypsin	8.27±0.89*	19.84±2.65

* 重复 6 次（6 replications）

2.3　HPLC 的分离

粘虫幼虫脑提取物用反相 C_{18} Sep-Pak 柱初步纯化，经 0.1% TFA 水溶液，0.1% TFA 的 17% 乙腈和 0.1% TFA 的 40% 乙腈依次洗脱，用放射化学的方法进行 AS 活性测定，发现 AS 样的活性物质主要集中在 40% 乙腈溶液中，然后将这部分有 AS 活性的组分进行 HPLC 的分离。

HPLC 的分离用反相 C_{18}柱，甲醇溶液的梯度洗脱，样品分离的色谱图见图 2。

2.4　经 HPLC 分离后各洗脱组分的 AS 活性测定

由图 3 可以看出，经反向 C_{18}柱 HPLC 分离，用相当于 5 个脑当量的洗脱组分，对未交配雌成虫 CA 的活性测定表明，含有 AS 活性的洗脱组分主要集中在组分 1～20，甲醇浓度为

5.2%～28%；组分30～60，甲醇浓度为40%～76%。在组分1～20中，对JH合成的抑制大于50%的有组分3、5和11，在组分30～60中，对JH合成的抑制大于50%的有组分40、54和60。而在组分20～30，甲醇浓度为28%～40%中，表现出对CA合成JH的促进作用，其中组分22和24，能使CA合成JH的能力提高60%以上。

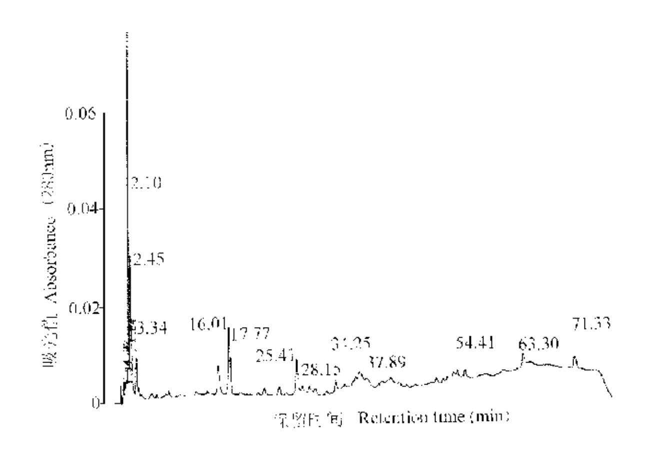


图2 粘虫幼虫脑提取物经反相C_{18}柱HPLC分离的色谱图

Fig.2 Separation of brain extracts of last instar larvae*M. separata* by HPLC with a reverse-phase C_{18} column and linear methanol gradient

进样量为250 μL含250个粘虫幼虫脑当量 Injection with 250 brain equivalents/250 μL

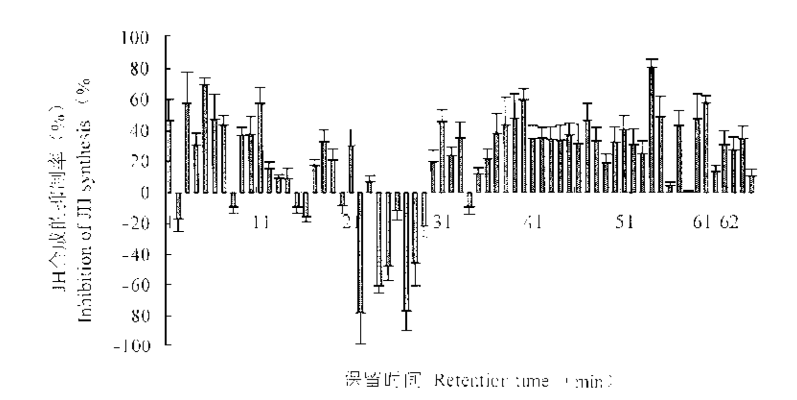


图3 粘虫幼虫脑经HPLC分离后各洗脱组分对JH合成的抑制率

Fig.3 Inhibition of JH synthesis by the fractions from HPLC with brain extracts from last instar larvae of *M. separata*

3 讨论

粘虫末龄幼虫脑提取物对CA合成JH的研究表明，末龄幼虫脑中存在能抑制CA合成JH

的 AS 样的活性物质，并且对胰蛋白酶敏感，经胰蛋白酶水解后，AS 样的活性明显降低，这一点与 Granger 等[7]在 *M. sexta* 幼虫脑中发现有 AS 活性的神经肽的结果一致。

来自幼虫脑的提取物经一次 HPLC 分离后，有 AS 活性的组分主要分布在甲醇浓度为 5.2%～28%（组分 1～20）和 40%～76%（组分 30～60）。在组分 30～60 中，对离体 CA 的 JH 合成抑制率大于 50% 的组分有 40、54 和 60，正好落在已知肽，促黄体激素释放激素（Luteinizing hormone-releasing hormone，LHRH）和生长激素抑制素-14（Somatostatin-14）以同样的甲醇梯度，经 HPLC 分离后的出峰时间范围内，它们的保留时间分别为 39.6 min 和 54.5 min。Woodhead 等[1]在用 HPLC 分离和纯化太平洋折翅蠊的 AS 时，用已知肽 LHRH 和 Somatostatin-14 作标准来标记含 AS 活性的组分的保留时间。因此我们的结果也证实了这一点。所不同的是在组分 1～20 中也有 AS 的活性物质存在，其中抑制率大于 50% 的组分有 3、5 和 11，主要集中在前十几分钟内。而 Woodhead 等分离太平洋折翅蠊的 AS 时，认为第一次 HPLC 的洗脱组分 1～10 没有 AS 活性，所以组分 1～10 的 AS 活性没有检测。粘虫幼虫脑提取物经 HPLC 分离，有高抑制活性的组分须进行下一步的分离纯化，以期能弄清 AS 的结构。

有趣的是，幼虫脑提取物经第一次 HPLC 分离，甲醇浓度在 28%～40%（组分 20～30）范围内的洗脱组分表现出对 CA 合成 JH 的促进作用。有研究表明，AS 和 AT 可存在于不同种的昆虫中，如蜚蠊目、鳞翅目和双翅目等[2]；也可在同种昆虫的不同发育阶段存在，如在 *M. sexta* 中，已从成虫脑中分离出一种 AT[8]，从被成虫脑中分离出一种 AS[3]，以及在末龄幼虫脑中证明有 AS 活性物质存在[7]，这一点也表明鳞翅目昆虫神经肽类激素对 CA 的调控比较复杂。我们对粘虫幼虫脑的分离，其分离组分表现出既有 AS 的活性，又有 AT 的活性，说明对某些昆虫来说，AS 和 AT 可能同时存在，如果 AS 的作用大于 AT，则表现出对 JH 合成的抑制，否则则对 JH 的合成起促进作用。因此 AS、AT 在个体发育中的消长规律和生理作用有待进一步研究。

参　考　文　献（References）

［1］ Woodhead A P，Stay B，Seidel S L *et al*. Primary structure of four allatostatins: Neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1989，86：5 997～6 001

［2］ Bendena W G，Garside C S，Yu C G *et al*. Allatostatins：Diversity in structure and function of an insect neuropeptide family. Annals. N. Y. Acad. Sci.，1997，814：53～66

［3］ Kramer S J，Toschi A，Miller C A *et al*. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1991，88：9 458～9 462

［4］ 毕富春. 粘虫的简易人工饲料及防腐剂对生长发育的影响. 昆虫知识，1983，20（6）：260～263

［5］ Feyereisen R，Tobe S S. A rapid partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. Anal. Biochem.，1981，111：372～375

［6］ Tobe S S，Clark N. The effect of L-methionine concentration on juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the cockroach，*Diploptera punctata*. Insect Biochem.，1985，15：175～179

［7］ Granger N A，Janzen W P. Inhibition of *Manduca sexta* corpora allata *in vitro* by a cerebral allatostatic neuropeptide. Mol. Cell Endocrinol.，1987，49：237～248

［8］ Kataoka H，Toschi A，Li J P *et al*. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. Science，1989，243：1 481

Preliminary isolation and purification of allatostatin from *Mythimna separata*

OUYANG Ying-chun, TANG Shuang, GUAN Xue-chen, FANG Yu-ling
(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: In this report, a preliminary isolation of AS from the brains of larvae, *Mythimna separata*, is described. The AS-activity material which can inhibit JH synthesis by CA occurs in the brains of last instar. The ability of brain extract to inhibit JH synthesis *in vitro* was tested by radiochemical assay. Using 1 brain equivalent, 51% inhibition of JH synthesis was achieved. If the brain extract was pretreated with trypsin, the inhibitory effect of the extract was greatly reduced. Assays of fractions from the reversal-phase C_{18} column of HPLC separation showed that materials with AS activity were eluted between 5.2% to 28% methanol (fraction 1~20), and between 40% to 76% methanol (fraction 30~60). Assays of fractions 3, 5, 11, 40, 54 and 60 using 5 brain equivalents per pair of CA showed >50% inhibition of JH synthesis. Further purification of the fractions from the C_{18} column with allatostatic activity is in progress.

Key words: *Mythimna separata*; allatostatin; brain extract; HPLC